

平成 29 年度
清酒酵母・麴研究会
講演要旨集

日時 平成 29 年 10 月 10 日 (火)

場所 北とぴあ 第 1 研修室

東京都北区王子 1 丁目 11 番 1 号

清酒酵母・麴研究会

プログラム

- 13:00～13:20 清酒酵母・麴研究会 総会
- 13:20～13:50 「リンゴ酸高生産清酒酵母の原因遺伝子の同定と育種への応用」
月桂冠株式会社 根来 宏明
- 13:50～14:20 「無通風箱培養法を利用した固体培養における麴菌の生育と酵素生産」
岡山県工業技術センター 伊藤 一成
- 14:20～14:50 「鹿児島県における焼酎酵母の研究」
鹿児島県工業技術センター 安藤 義則
- 14:50～15:10 ～休憩～
- 15:10～15:40 「麴菌酸性プロテアーゼは、清酒メタボロームにどう影響を及ぼすのか？」
酒類総合研究所 織田 健
- 15:40～16:45 特別講演「翻訳抑制ストレス下でも発現する酵母遺伝子の解析とその応用」
京都工芸繊維大学 井沢 真吾
- 17:00～ 懇親会 (北とぴあ9階901会議室)

リンゴ酸高生産清酒酵母の原因遺伝子の同定と育種への応用

根来 宏明（月桂冠株式会社 総合研究所）

1. はじめに

清酒中には様々な呈味成分が含まれ、糖質、アミノ酸、有機酸などがその代表的な例である。リンゴ酸は主要な有機酸の一つであり、発酵中に酵母によって生産される。爽やかな酸味を持ち、酸味にインパクトを持たせた清酒を造る場合にはリンゴ酸含有量を高くすると好ましい味になるとされるため、これまでに様々なリンゴ酸高生産酵母の育種法が開発されてきた。高生産となるメカニズムがいくつか報告されているが、一方で原因となる具体的な変異遺伝子については特定されていなかった。そこで、取得したリンゴ酸高生産清酒酵母について、変異遺伝子の同定を試みた。さらに得られた知見を応用し、リンゴ酸生産能を制御する育種を行った。

2. *VID24* 遺伝子変異の同定と育種への応用

2-1. 原因遺伝子 *VID24* の同定¹⁾

きょうかい酵母 901 号 (K-901) を親株として、コハク酸ジメチル (DMS) 感受性を指標にリンゴ酸高生産酵母「K-901H」を取得した。高生産となる原因を解明するため、まずは候補遺伝子のサンガーシーケンスや、リアルタイム PCR による発現解析を行ったが、明瞭な結論は得られなかった。次に全ゲノムシーケンスにより K-901 と K-901H 間の変異点を抽出すると、150 個の遺伝子上にミスセンス変異またはナンセンス変異を検出した。これらの変異遺伝子のうち、解糖系、糖新生、TCA 回路、アミノ酸合成などの中心代謝に関連する遺伝子を調べた結果、*VID24* 遺伝子が K-901H 型の変異を持つことにより、リンゴ酸高生産かつ DMS 感受性となることを見出した。

2-2. リンゴ酸高生産となる機構の解析¹⁾

Vid24 は GID (Glucose Induced degradation Deficient) 複合体の構成要素として知られる。GID 複合体はグルコースの存在に応答し、糖新生酵素 (Fbp1、Pck1、Mdh2 等) をユビキチン化して分解する役割を持つ。これらの糖新生酵素が K-901H 株のリンゴ酸高生産に寄与していると推察して検討を進めると、Mdh2 (細胞質リンゴ酸デヒドロゲナーゼ) の関与が明らかになった。*VID24* 欠損株では細胞内に Mdh2 を蓄積することが報告されていることから、K-901H において分解制御を受けなくなった Mdh2 によりオキサロ酢酸をリンゴ酸に変換する経路が促進され、リンゴ酸高生産になったと推察した。

2-3. 育種への応用²⁾

二倍体である K-901H の *VID24* 変異はヘテロ接合型であったことから、この変異がもたらす表現型は不完全優性あるいは優性の形質であると考えられた。遺伝子操作により変異をヘテロおよびホモ接合型とした株を作製して検証すると、変異型のコピー数に応じてリンゴ酸生産能および DMS 感受性が上昇したことから、*VID24* 変異は不完全優性であった。これにより *VID24* 変異の接合型を操作することで、リンゴ酸を自在に制御できると考えられた。

上記で作製したホモ接合型変異株は遺伝子組換え技術を用いているため、清酒醸造に利用することは難しい。そこで、遺伝子組換えを用いない、ヘテロ接合性の消失 (LOH) によるホモ接合型変異株の取得を試みた。ヘテロ接合型と変異ホモ接合型との表現形の差を利用してスクリーニング系を構築した結果、K-901H を親株としてホモ接合型 *VID24* 変異株「K-901H×2」を単離した。K-901H×2 は清酒

醸造においてK-901Hの2.2培のリンゴ酸生産量を示し、狙い通りリンゴ酸生産能をさらに増強することができた。

3. PEX22 遺伝子変異の同定

3-1. 原因遺伝子 PEX22 の同定³⁾

きょうかい 701 号 (K-701) を親株として、香気成分生成に優れる F-701 を取得し、さらに DMS 感受性を指標としてリンゴ酸高生産酵母「F-701H」を取得した。K-901H の場合と同様に、全ゲノムシーケンスによる変異点の抽出を行うと、F-701 に対して F-701H には 15 個のミスセンス変異またはナンセンス変異を検出した。F-701H では VID24 に変異が検出されなかったことから、別の機構によりリンゴ酸高生産になっていると考えられた。変異遺伝子を個別に調べると、PEX22 遺伝子のホモ接合型ナンセンス変異が原因であった。

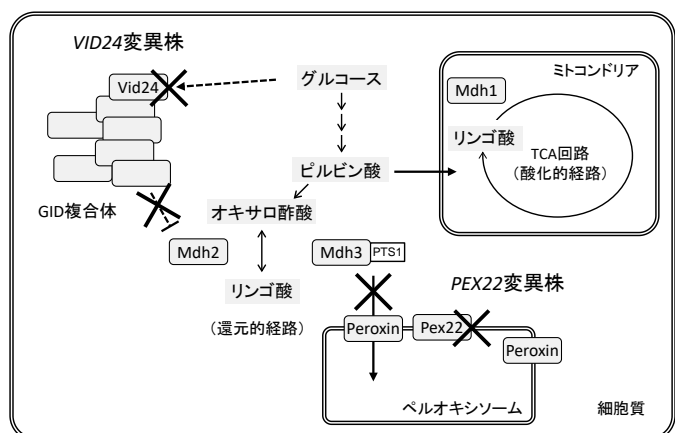
3-2. リンゴ酸高生産となる機構の解析³⁾

Pex22 は、ペルオキシソームの恒常性維持に関与するタンパク質群である“ペルオキシシン”の一つである。酵母が保有する 29 つのペルオキシシンのリンゴ酸生成への影響を調べると、peroxisome targeting signal 1 (PTS1) 保有タンパク質をペルオキシソームへ輸送する役割を持つペルオキシシン (Pex22 もこれに含まれる) を欠損した場合に、リンゴ酸生成能が上昇した。PTS1 保有タンパク質にはグリオキシル酸回路に関与する Mdh3、Mls1、Mls2、Cit2 等が含まれる。これらの酵素を検討した結果、PEX22 変異株は Mdh3 の局在がペルオキシソームから細胞質へ変化することでリンゴ酸高生産となることを確認した。

4. おわりに

清酒醸造においてリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH) がリンゴ酸生成に関わることは過去の報告からも示唆されていたが、MDH 制御因子の変異がリンゴ酸高生産に寄与するという機構を初めて明らかにした (下図)。嫌気的な環境である清酒においては、リンゴ酸は酵母の細胞質内でオキサロ酢酸からの還元的経路により生成するというモデルが示されており、我々の提唱する機構を支持するモデルと言える。今回、具体的な変異遺伝子を同定したことで、酵母のリンゴ酸生成に対する理解をより深めることができたであろう。得られた知見が清酒中の酸味をコントロールするための一助となれば幸いである。

図. VID24 変異株および PEX22 変異株のリンゴ酸高生産となる機構



- 1) Negoro et al., J. Biosci. Bioeng., 121, 665-671 (2016)
- 2) Negoro et al., J. Inst. Brew., 122, 605-611 (2016)
- 3) Negoro et al., J. Biosci. Bioeng., in press

無通風箱培養法を利用した固体培養における麹菌の生育と酵素生産

岡山県工業技術センター 伊藤一成

① 新規固体培養法の確立とその特性解析

固体培養は固体状原料を基質とする培養であり、清酒を含む発酵食品に必要な麹造りがこれに該当する。固体培養は様々なバイオマスとの相性が良いことに加え、液体培養と比較して基質当たりの菌体量が多く、低水分により多くの酵素遺伝子が高発現することから酵素生産性が極めて高い。また、生産物当たりの発酵槽の容積が少なくすむなど、コスト面でも有用な培養法である。その反面、物質の低移動性による培養状態の不均一性とそれに伴う再現性の低さ、培養途中の管理制御の難しさなど低水分であるがゆえの問題や、複雑で多様な因子による影響が絡み不明確な点も多く、産業的利用には大きな障壁となっている。堆積式培養では、様々な方法があるものの、基質内部の均一な制御は極めて困難である。これを攪拌と通風による熱移動で解消したのが堆積通風式培養であるが、攪拌による菌体破壊の影響は排除できず、複雑な装置を要する。

我々は、基質内部を均一に制御でき、攪拌の必要のない簡便な培養システムの構築を目指し、発酵熱により生じる水蒸気の移動を緩やかに制御することに着目、無通風箱培養法(NAB)を確立した。小麦ふすまを基質とした培養では採取場所によらず極めて均一で、再現性の高い品温経過と水分状態となっていた。このとき酵素生産も高い再現性を示した。培養開始時の水分量を変えて培養すると、いずれの条件でも基質が良く乾くこと、箱外部の湿度(水蒸気分圧)を変えることにより、培養中に乾燥具合を制御できることが判った。このときタンパク質生産量が増加し、その最適条件は高水分側にシフトした。酵素活性を調べてみると、それぞれに増加率や最適条件は異なる(生産のための水分要求タイプや温度などの他の要因による)ものの、低水分から中水分条件下で良く生産される酵素は、その効率の良い生産範囲が高水分側に大きく広がっていた。すなわちNABを用いれば、水分要求の異なる酵素でも複数同時に効率よく生産できるといえる。酵素生産を経時的に調べてみると、いずれの酵素でも生産の開始が早く、その生産速度が大きく上昇しており、菌体の増殖経過とよく相関していた。水分状態の解析から、NABでは基質が効率よく徐々に乾くことで、対数増殖期に最適な水分活性となり、菌体増殖が活発になると考えられた。さらに従来のも固体培養に比べNABでは培養終了時に、より低水分な状態になるためだと思われるが、生産された酵素活性の安定性が向上していることも注目に値する。

これまで固体培養では、培養状態を均一に保ちながらその制御を実現することは極めて困難だったが、NABを用いることで容易に可能になった。そこで、NABの特性(基質の乾き具合を制御できる、乾くことで酵素生産性が向上する、菌体の生育が早い)をもとに、菌体量を確保してから乾燥させる制御を試みた。その結果、菌体量は同じでも、乾き具合の違いによりタンパク質生産量が変化し、比較的緩やかに乾かしたときにタンパク質生産量が増加することが判った。このとき、いずれの酵素でも菌体当たりの生産が向上していることから、培養中に乾かす経過を均一に制御することで、より効率的な複数同時の酵素生産が実現でき

ることが示された。このように NAB は、無通風状態で攪拌の必要なく基質内部の均一な制御とその高い再現性を実現でき、培養制御も可能であることから、固体培養の潜在的な問題点を解消できる新たな培養法になり得るといえる。

② 試験製麴法の確立と麴の品質評価指標の構築（NAB の応用例）

多くの清酒製造現場では、長年培ってきた杜氏の経験と勘に頼った製造が行われており、科学的根拠に基づく評価が未だ十分ではない。我々は、清酒製造工程のうち同じ固体培養であり最も重要視されている製麴に着目し、麴の品質安定・向上にむけた研究を実施している。この研究には、安定で目的にあった麴造りを可能とする試験製麴法の構築が必須である。NAB は実験室レベルだけでなく製造現場にも応用可能な中規模のスケールで行う方法であり、基質の均一な培養状態の維持とその培養期間中の制御を可能にする技術である。これを応用すれば様々な条件下で、スケールの大小によらず製造現場と同等の試験製麴が可能だと考えられた。そこで、酒造好適米を利用した NAB による試験製麴を行ったところ、正常な麴としての状貌をなし、局所的な不均一さは見られず、内部にもしっかりと菌糸が入り込んでいた。また、十分な酵素力価とそのバランス、菌体量を有していた。NAB による試験製麴は製造現場と遜色のない麴の再現を可能にしており、試験製麴法として問題ないと判断した。

製造現場では麴の品質評価指標の 1 つとして、麴菌が蒸米に増殖して白く観察される現象である破精を重要視しており、麴菌の増殖及び酵素生産の代替指標として利用されている。破精形成はリアルタイムに肉眼で確認できることから、手軽に麴の品質評価指標として利用できるものの、一部の研究レベル以外では目視による大まかな確認が行われているのみである。科学的根拠に基づいて麴の品質と破精の関係性を述べるためには破精の数値化が必須なことから、破精の評価法確立について検討した。試験製麴により得られた麴をデジタルマイクロスコプで観察し、破精を確認できる鮮明な画像を得た。画像処理ソフトにより、破精部分と非破精部分を容易に区別することができ、それらの面積比から破精回りと破精込みの迅速な数値化に成功した。麴粒ごとの破精具合にはばらつきがあるが、50 粒以上の分析で一定値に収束したことから、麴 1 粒の評価はもちろん、バッチとしての評価が可能であると考えている。このときの菌体当たりの酵素生産量や菌体量の分析結果も照らし合わせ、破精の進行メカニズムを確認することもできた。

NAB を用いた固体培養法は、多様な物質生産の発展に大きく貢献できる基盤技術であると考えている。今後も固体培養について継続的に研究を進めて行く予定であり、その過程で麴菌の不明確な部分が 1 つでも明らかにできることを期待している。

鹿児島県における焼酎酵母の研究

鹿児島県工業技術センター 安藤 義則

1 鹿児島県における焼酎酵母の開発

当センターでは、本県の主力産業である本格焼酎業界のニーズに対応するため、酒質の多様化や収量の向上などを目的とした焼酎酵母の開発を行ってきた。

昭和 27 年、工業技術センターの前身である工業試験場の勝田らが沖縄泡盛もろみから鹿児島工試酵母(Ko)を分離¹⁾した。次いで、昭和 40 年代に県酒造協同組合との共同で県内芋焼酎もろみから鹿児島 2 号酵母(K2)を分離した。この K2 による焼酎は揮発酸が高く味が濃いという特徴を持ち、現在でも本県の主力酵母である。その後、平成 7 年に県内芋焼酎もろみから味香りとともにソフトで、軽く、華やかな焼酎が製造できる鹿児島 4 号酵母(C4)、発酵力の旺盛でアルコール取得が K2 に比べ 2～4%向上する鹿児島 5 号酵母(H5)を分離した²⁾。また、平成 9 年に芋焼酎に馴染みのない人にとって抵抗のある香りを和らげる目的として、酢酸イソアミル高生産株である Ko-CR37 を育種した³⁾。さらに、平成 13 年にはこれまで取り組みのなかった黒糖焼酎においても、高温耐性などの特性を持つ鹿児島 6 号(A6)を育種した⁴⁾。

2 差し酏が収量と酒質に及ぼす影響⁵⁾

本県の焼酎醸造では、発酵スターターとして差し酏が利用されている。製造現場では、差し酏がある程度繰り返されることで、培養酵母の仕込より Alc 収量、酒質は安定することが経験的に知られている。そこで、差し酏の効果と意義について知見を得るため次の研究を行った。まず、蔵付酵母の生息状況を調査するため、15 場にてもろみを採取し添加酵母の純度を測定した。結果、K2 を使用している全ての酒造場で、差し酏の進行により蔵付酵母がもろみ中で大多数を占めていた。一方、H5 は純度が維持されていた。また、蔵付酵母として単離した 42 株は、ITS 領域の塩基配列からそのほとんどは *S. cerevisiae* であることが示唆された。次に、小仕込試験にて差し酏を再現したところ、差し酏 10 回で蔵付酵母が検出され始め、これに伴い揮発酸度が低下し、もろみ Alc 分が上昇した。次に、K2 を使用している酒造場にて詳細に調査したところ、差し酏 1～3 回の間で K2 の割合が低下し、これに伴い揮発酸度が低下し、製品の高級 Alc 組成も変化した。同酒造場より得られた蔵付酵母を用い小仕込を行ったところ、K2 より発酵が速やかに進み、製品の高級 Alc 組成は同蔵の差し酏による製品に類似していた。

以上のことから、差し酏により蔵付酵母がもろみ中で優勢となり、各蔵における酒質の多様化・収量の向上に寄与していることが確認できた。また、本県の主力酵母である K2 はもろみ中での増殖能が比較的強く蔵付酵母への入れ替わりが起りやすいが、発酵力のより強い蔵付酵母が速やかに優勢となるため、腐造などの危険性は少ないことが示唆された。

3 本格焼酎における混合醸造の開発⁶⁾

酒質の多様化を目的とし、芋焼酎における酵母混合醸造について検討した。その結果、仕込み時に2種類の酵母を同量混合しても、1次もろみの段階で酵母比率が大きく変化していた。また、混合醸造のアルコール、香気成分の生成量及び酒質は、両酵母の存在比率に対応したものであり、酒質の多様化という混合醸造の効果を確認できた。

各酵母の増殖能について検討したところ、培養液中のクエン酸濃度が大きくなるに従い、酵母間の増殖速度の差が大きくなった。このことが、混合醸造における1次もろみで、添加した酵母の存在比率が大きく変化する要因になると示唆された。そこで、混合醸造における酒質の安定化策として、2次もろみから混合醸造を検討した。その結果、2次もろみからの混合醸造は酵母比率が安定するとともに、酵母の優劣に差がある場合であっても両酵母の特徴がより出やすい仕込み法として有効であることが示唆された。

4 鹿児島乾燥酵母の導入

本県の本格焼酎の製造に用いる鹿児島酵母は、注文に応じ県酒造協同組合が製造し焼酎メーカーへ送付している。従来の培養酵母は注文を受けてから作成するため、メーカーの手元に届くまでかなりの数日を要していた。加えて、使用期限が冷蔵庫内でおよそ2週間と短いことから、焼酎メーカーは手元に酵母をストックできなかった。このため、製造のトラブル時や急な製造計画の変更の際に、新たな酵母を準備することができず対応できないこともあった。特に離島では、天候によっては酵母の到着が遅れることもあり、酵母の安定供給の面で課題を有していた。そこで、K2, C4, H5, A6 について乾燥化を行った。乾燥化により酵母の保存性、運搬性が飛躍的に向上し、離島にある焼酎メーカーに対して安定的に酵母を供給することができるようになった。

参考文献

- 1) 勝田常芳, 西野勇実, 山口力, 前原善義: 鹿児島工試発酵工業部研究速報 1, p9 (1952)
- 2) 高峯和則, 瀬戸口真治, 亀澤浩幸, 神渡巧, 緒方新一郎, 尾ノ上国昭, 濱崎幸男: 鹿児島県工業技術センター研究報告 8, p1 (1994)
- 3) 特許 3 0 5 1 7 1 5 号
- 4) 特許 3 8 7 6 9 7 5 号
- 5) 安藤義則, 瀬戸口真治, 亀澤浩幸: 鹿児島県工業技術センター研究報告 23, p5 (2009)
- 6) 安藤義則, 瀬戸口真治, 亀澤浩幸: 鹿児島県工業技術センター研究成果発表会予稿集 p12 (2015)

麴菌酸性プロテアーゼは、清酒メタボロームにどう影響を及ぼすのか？

酒類総合研究所 織田 健

清酒醸造において麴の主要な役割は、酵素の供給である。清酒醸造の現場においては、麴の出来を評価する上で、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、酸性プロアーゼ、酸性カルボキシペプチダーゼの4つを指標として分析することが多い。なかでも麴菌の酸性プロテアーゼ(APase)は、酵母へのN源、S源の供給や清酒の呈味に影響を与える重要な酵素である。APaseは、米貯蔵タンパク質PB-IIのグルテリンを主に分解するとともに、アミラーゼの無効吸着の解除¹⁾、原料米全体の溶解に関わることなどが知られている。また、麴菌ゲノム解析より57種のエンド型プロテアーゼ遺伝子が判明する中²⁾、菌体外酸性プロテアーゼの一つである *pepA* 遺伝子については、液体培養、固体培養での生産性の比較や、製麴中の遺伝子発現解析^{3), 4)}が行われている。PEPAは麴菌の生産するプロテアーゼ類の中で最も存在量が多いが、PEPAの米タンパク質分解への影響は不明である。そこで、本研究では *pepA* 破壊株を用いて、製麴や小仕込み試験を行い、PEPAによる清酒醸造への影響を検討した。さらに、PEPAが清酒醸造中のペプチド、アミノ酸生成または酒質にどのように関わっているのかを解明することを目的とした。

1. PEPAの米タンパク質分解への寄与度

定法により麴菌 *pepA* の破壊株およびその相補株を取得し、米麴を作製し、酵素抽出液を調製して、活性の減少及びPEPA発現の消失を確認した。さらに米グルテリンを基質としたAPase活性測定を行ったところ、破壊株で比活性が約90%減少した。このことから、APaseのうちPEPAがグルテリン分解の大部分を担う酵素であることが明らかとなった。

2. PEPA破壊による麴、清酒メタボロームへの影響

米麴での *pepA* 破壊の影響を検討するため、各種酵素生産量を検討すると、酸性カルボキシペプチダーゼ活性は上昇し、 α -アミラーゼ活性は減少するなど、他の醸造で重要な酵素活性の変化も大きかった。APase活性が顕著に減少したことから、破壊株の米麴では、タンパク質・ペプチド・アミノ酸の組成比が変化していると考え、窒素元素分析により窒素存在比を検討した。破壊株では可溶化するN源が減少し、タンパク質・ペプチド画分はあまり変化せず、アミノ酸画分が有意に減少した。よって破壊株は、仕込み前半のN源供給の低下が示唆された。

実際に、小仕込み試験を行うと、発酵期間前半に発酵速度が顕著に減少し、N源の供給不足により酵母の増殖またはエタノール代謝速度に影響したと考えられた。また、破壊株の仕込みではエキス分が半減、粕歩合が2倍に上昇し、米の溶解が著しく低下した。

一般成分では、破壊株において全ての測定値で有意な減少が見られた。

続いて、成分への影響を明らかにするために米麴および製成酒のアミノ酸分析・メタボローム解析を行った。アミノ酸組成分析では、米麴と製成酒ともに破壊株で多くのアミノ酸が減少した。特に米麴のアミノ酸生成において破壊株での減少がより大きく、アルギニン、リジンの減少が顕著であった。また、米麴と製成酒ではアミノ酸の組成比が変化した。特にグルタミンやアラニンの変化量が大きかった。メタボローム分析データにおいて主成分分析を行ったところ、米麴、製成酒ともに破壊株と対照株は、明確に2分された。ローディングプロット解析では、米麴、製成酒ともにアルギニン、フェニルアラニンが分散に大きく寄与し、米麴ではグルタミン、チロシン、ロイシン、製成酒ではプロリンの様な比較的高いアミノ酸も分散に寄与した。さらに、未同定の物質の寄与も見られ、その一つは分子量からペプチドであると推定された。

以上より、*pepA* 破壊の及ぼす影響は甚大で、米麴の酵素バランスに影響を与えると共に清酒醸造では米の溶解、米タンパク質の分解、N 源、S 源の供給に影響を与え、発酵経過、製成酒の成分に影響を与えていた。

3. 米麴中で発現しているタンパク質分解酵素

当所では、これまでの研究の経緯から Genechip アレイ解析により米麴における麴菌遺伝子発現を解析していた。そこで文献および MEROPS データベースなどの情報よりアノテーションの見直しを実施し、約 130 遺伝子のタンパク質発現酵素遺伝子の発現プロファイルを明らかにした。米麴で発現している別の酸性プロテアーゼ群が、PEPA の代替として機能したと考えられる。今後は、このデータを活用し、酒の呈味に関わるペプチダーゼなど清酒醸造で重要な酵素の洗い出しを行っていきたい。

参考文献

- 1)岩野君夫, 布川弥太郎、醸造協会誌, 71(12), 943-947(1976)
- 2)北本勝ひこ編著, 分子麴菌学(改訂版), 188-197(2012)
- 3)Gomi. K., et atl., Biosci. Biotech Biochem, 57(7), 1095-1100(1993)
- 4)Kitano H., et al., J.Biosci Bioeng, 93(6), 563-567(2002)

翻訳抑制ストレス下でも発現する酵母遺伝子の解析とその応用

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 井沢真吾 thioredoxin@kit.ac.jp

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はアルコール発酵を通じて自身でエタノールを産生することもあり、他の生物種と比べて高いエタノール耐性を示すことが知られている。しかし、高濃度のエタノールは酵母にとってもストレスとなり、細胞内に様々な障害を引き起こす。6%以上のエタノールストレス下では、ストレス応答性の転写因子を介して転写パターンが変化し (Alexandre *et al.* 2001)、mRNA 核外輸送の抑制 (Takemura *et al.* 2004) や脱分極 (Kubota *et al.* 2004) などが引き起こされる。清酒やワインの醸造過程ではさらに高いレベルにまでエタノール濃度が上昇することから、醸造過程終盤の酵母はかなり過酷な環境下にあると予測される。醸造過程終盤の酵母に関する理解を深めるためのアプローチとして、我々は高濃度エタノールに対する酵母のストレス応答の解析をおこなっている。

10%エタノールストレス下では、様々な遺伝子の転写が活性化されるものの、遺伝子発現に不可欠な mRNA の核外輸送や翻訳活性が強く抑制されてしまう (Yamauchi and Izawa 2016)。また、翻訳抑制によって非翻訳状態になった mRNA はリボソームから離れ、stress granule (SG) や processing body (PB) を細胞質に形成する (Kato *et al.* 2011)。これらは、転写の活性化がタンパク質レベルの上昇につながらない可能性を示唆しており、事実、多くの遺伝子で高濃度エタノールストレス下における mRNA レベルの上昇がタンパク質レベルに反映されないことが確認されている。

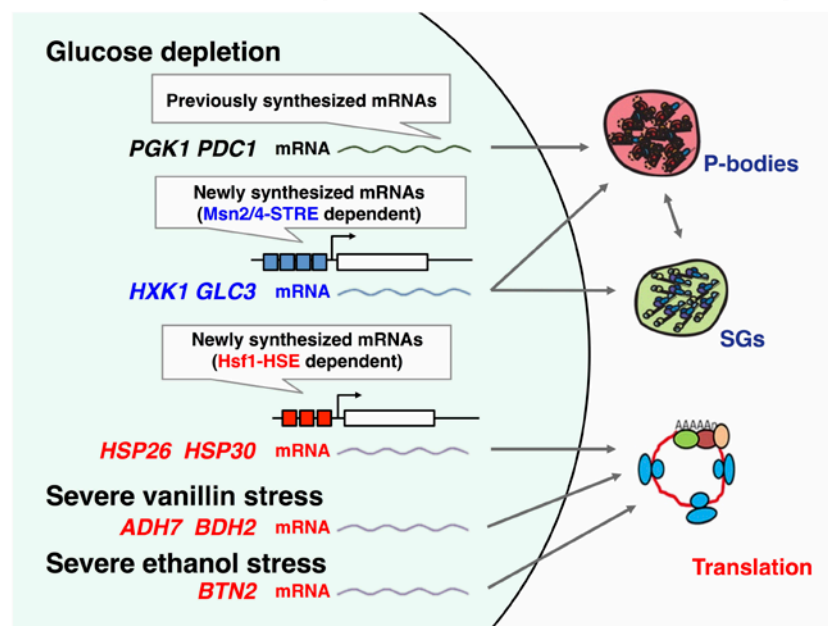
一方、このような翻訳抑制下でも、ストレスへの対処に必要とされる一部の遺伝子の mRNA は翻訳され、タンパク質が効率的に合成されることが近年明らかとなった。グルコース枯渇下でも酵母の翻訳活性は強く阻害され、大半の mRNA が翻訳されなくなるのに対し、small heat shock protein をコードする *HSP26* mRNA はスムーズに翻訳される。さらにこのような優先的翻訳が mRNA 上の配列に依存したものではなく、Hsf1 の認識配列 (heat shock element : HSE) を持つプロモーター領域に依存したものであった (Zid and O'Shea, 2014)。そこで、高濃度エタノールストレス下で優先的に翻訳される遺伝子の探索に取り組んだ結果、エタノールによる翻訳抑制下で *BTN2* が転写活性化され、さらに優先的に翻訳されることを見出した (Yamauchi and Izawa, 2016)。また *BTN2* の優先的翻訳もプロモーター領域に依存したものであり、*BTN2* プロモーターを用いることで、*BTN2* 以外の遺伝子の発現を高濃度エタノールストレス下で誘導することが可能であった。

Btn2 は細胞内で生じた変性タンパク質を凝集・隔離する上で重要な働きをしている (Miller *et al.*, 2015)。興味深いことに、高濃度エタノールストレス下で作られた *Btn2* タンパク質は、エタノールの除去によって速やかに分解された。細胞内の変性タンパク質の凝集を示

す Hsp104-GFP の granule も 10%エタノールストレス下で形成が誘導されたが、エタノールの除去で消失したことから、エタノールによる変性タンパク質の蓄積と *BTN2* の発現の間には強い相関があるのではないかと考えている。

本研究会では、醸造分野における *BTN2* プロモーターの活用とともに、*BTN2* を通して醸造過程終盤の酵母の生理について考察したいと考えている。

プロモーター依存的な翻訳抑制下でのmRNAの優先的翻訳



References

- Alexandre *et al.* (2001) Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **498**, 98–103; Kato *et al.* (2011) Severe ethanol stress induces assembly of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **28**, 339–347; Kubota *et al.* (2004) Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 968–972; Miller *et al.* (2015) Compartment-specific aggregates direct distinct nuclear and cytoplasmic aggregate deposition. *EMBO J.* **34**, 778–797; Takemura *et al.* (2004) Stress response in yeast mRNA export factor: reversible changes in Rat8p localization are caused by ethanol stress but not heat shock. *J. Cell Sci.* **117**, 4189–4197; Yamauchi and Izawa (2016) Prioritized expression of *BTN2* of *Saccharomyces cerevisiae* under pronounced translation repression induced by severe ethanol stress. *Front. Microbiol.* **7**, 1319; Zid and O’Shea (2014) Promoter sequences direct cytoplasmic localization and translation of mRNAs during starvation in yeast. *Nature*, **514**, 117–121.